

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Producción de biomasa pigmentada de color rojo
a partir de un cultivo mixto, en medio sintético y su
evaluación en nutrición de camarón blanco
Litopenaeus vannamei.**

T E S I S

**Como requisito parcial para optar al grado de:
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

PRESENTA

Q.B.P. Graciela García Díaz MSP

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. JUNIO DE 2000

GGD

Producción de biomasa pigmentada de color rojo
a partir de un cultivo mixto, en medio sintético y su
evaluación en nutrición de camarón blanco
Litopenaeus vannamei.

TD
SH380
.G37
2000
c.1

2000



1080124447

1080124447
1080124447
1080124447

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Producción de biomasa pigmentada de color rojo
a partir de un cultivo mixto en medio sintético

y su evaluación en nutrición de camarón blanco
Litopenaeus vannamei.



Para otorgar el grado de
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Producción de biomasa pigmentada de color rojo
a partir de un cultivo mixto, en medio sintético y su
evaluación en nutrición de camarón blanco

Litopenaeus vannamei.

TESIS

Como requisito parcial para optar al grado de:
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

PRESENTA

Q.B.P. Graciela García Díaz MSP

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. JUNIO DE 2000



TO
SH380
.G37
2000



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**Producción de biomasa pigmentada de color rojo
A partir de un cultivo mixto, en medio sintético
y su evaluación en nutrición de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.**

**Por
Q.B.P. Graciela García Díaz MSP**

**Para otorgar el grado de
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

COMITÉ DE TESIS

**Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez
Presidente**



**Dr. Dennis Ricque Marie
Secretario**



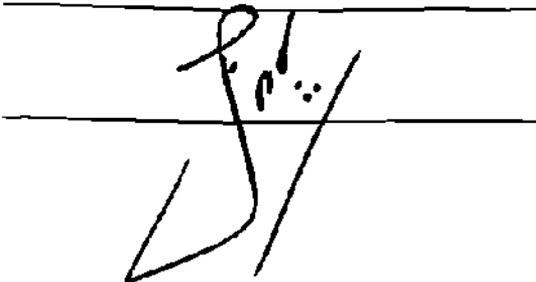
**Dr. Mohamad H. Badi Zabeth
Vocal**



**Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal (Co-Director)**



**Dr. Hiram Medrano Roldán
Asesor Externo**



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo brindado

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
Por la Beca otorgada para la realización del Doctorado, inscrito en el
Padrón de Posgrados de Excelencia.*

A la Secretaría de Educación por la Beca PROMEP

A MIS ASESORES Por el apoyo y confianza para realizar este trabajo.

Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez

Dr. Luis J. Galán Wong

Dr. Hiram Medrano Roldán

Dr. Mohammad H. Badii Zabath

Dr. Dennis Ricque Marie

*A mis compañeros del Depto de Bioquímica de la Fac. de Ciencias Biológicas
Q.B.P. Lilia Miranda, Dra. Leticia Hauad, M.C. Adriana Nuñez, Ing. Félix
Barrera, Q.B.P. José Garza Chavéz, Q.B.P. Juan Antonio Rodríguez Arzave,
M.C. Eduardo Martínez Vega, Dra. Azucena Oranday Cárdenas, Dra. María
Julia Verde Star, Dra. Catalina Rivas Morales por su amistad y óptimo
ambiente de trabajo.*

Por su apoyo a sacar adelante este trabajo a Claudio, Pablo, Martha, Mireya, David, Beatriz, Oscar y Martín alumnos de la maestría Recursos Alimenticios y Productos Acuicolas del programa de Maricultura Depto. de Ecología FCB-UANL; al estudiante Rodolfo Lozano Olvera, a la Q.B.P. Lucía Palacios por su asistencia en la Sala de Biotecnología Depto. de Microbiología e Inmunología FCB UANL y a los alumnos de maestría Victorino Cerón R. y Ma. De los Angeles Hernández de la Unidad de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Durango, Dgo.

Agradecemos a Francisco García García, SAFMEX, Toluca, México y a Eric Auclair, de Lesaffre Développement, Marcq-En-Baroeul Cedex, Francia, por proveer las muestras de Saccharomyces cerevisiae y β -glucano, así como la información concerniente a su composición. A Bernard Devresse y Marlene Dehasque de INVE Technologies, Baasrode, Bélgica, por proveer las cepas bacterianas; a Magda Iracheta por su ayuda en microbiología; a Gloria Yepiz Plascencia del CIAD, Hermosillo, México por su supervisión en la determinación de la fenoloxidasa. Al personal de investigación de Pyosa.

Agradezco el apoyo brindado en la ayuda en el escrito de esta tesis a licenciados en informática Verónica Arriaga y Jorge Flores; a los diseñadores gráficos Alicia Chapa, Mónica Pamela Espinoza y Jesús Lozano

Dedicatoria

POR RODEARME SIEMPRE DE SU INFINITO AMOR

A DIOS

A MIS PADRES

*María del Carmen Díaz Vda. De García
Baltazar García González**

A MI HERMANA

*María del Carmen García de Barragán
a mi cuñado favorito y Familia.*

A MIS HIJOS

*Oscar Eduardo Torres García
Graciela Ellen Torres García*
David Esteban Torres García*

A MIS AMIGOS

Indice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
I. Antecedentes.....	4
1.1 Ecología Microbiana.....	4
1.2 Procesos de Fermentación.....	6
1.3 Crecimiento Microbiano.....	8
1.3.1 Cultivo continuo para la producción de proteína Unicelular.....	12
1.3.2 Producción de carotenoides por un cultivo mixto mediante cultivo continuo.....	13
1.3.3 Determinación de la concentración celular.....	16
1.3.4 Determinación del color rojo en hongos y levaduras.....	17
1.4 Acuicultura.....	18
1.4.1 Cultivo del camarón.....	18
1.4.2 Importancia de las proteínas.....	19
1.4.3 Pigmentos en acuicultura.....	20
1.4.4 Actividad inmunoestimulante.....	22
II. Objetivos Generales.....	24
III. Material y Metodos.....	25
Etapa I - Producción de biomasa pigmentada.....	25
3.1 Identificación de microorganismos.....	25
3.2 Cultivo mixto.....	26
3.2.1 Material biológico.....	26
3.2.2 Preparación del medio de cultivo MM-LRM-ETOH.....	27
3.2.3 Preparación del inóculo a partir de la biomasa HPPR1A.....	27
3.2.4 Preparación del inóculo a partir de la biomasa HPPR1B.....	28
3.2.5 Cultivo continuo.....	28
3.2.6 Optimización de la producción de pigmento HPPR1A.....	28
3.2.6.1 Optimización de la producción de pigmento HPPR1A.....	28
3.2.6.2 Optimización de la producción de pigmento HPPR1B.....	29
3.2.6.3 Producción de pigmento HPPR2.....	29
3.2.7 Parámetros de evaluación del cultivo continuo.....	30
3.2.8 Caracterización química y bioquímica de la biomasa pigmentada....	34
Etapa II - Evaluación nutricional.....	36
3.3 Formulación de dietas experimentales.....	36
3.4 Análisis proximal de dietas experimentales.....	37

3.5 Pruebas de lixiviación.....	38
3.6 Material biológico.....	38
3.7 Condiciones experimentales, manejo de larvas.....	38
3.8 Bioensayo para evaluar la biomasa como fuente proteica.....	39
3.9 Bioensayo para la determinación de pigmentación.....	40
3.10 Bioensayo para determinar el coeficiente de utilización digestiva aparente de la proteína.....	42
3.11 Bioensayo para determinar la actividad inmunoestimulante.....	43
3.12 Análisis estadístico.....	46
IV. Resultados.....	47
Etapa I - Producción de biomasa pigmentada a partir de cultivo mixto en un proceso continuo.....	47
4.1 Identificación de microorganismos.....	47
4.2 Optimización de la producción de pigmento.....	51
4.2.1 Cinética de crecimiento.....	51
4.2.2 Evaluación de pigmentación y biomasa.....	53
4.2.3 Evaluación de la cinética del cultivo continuo.....	58
4.2.4 Coeficiente de transferencia y demanda biológica de oxígeno.....	61
4.2.5 Asociación simbiótica.....	62
4.3 Caracterización bioquímica de la biomasa pigmentada HPPR1B.....	63
4.3.1 Análisis proximal de la biomasa.....	63
4.3.2 Caracterización de carotenos.....	63
4.3.3 Perfil de aminoácidos.....	64
4.3.4 Digestibilidad de la proteína <i>in vitro</i>	66
Etapa II - Evaluación nutricional de la biomasa pigmentada HPPR1B en camarones blancos juveniles <i>Litopenaeus vannamei</i>	67
4.4 Bioensayo de crecimiento.....	67
4.4.1 Análisis proximal de ingredientes.....	67
4.4.2 Análisis proximal de las dietas.....	68
4.4.3 Evaluación biológica.....	68
4.4.3.1 Calidad de agua.....	68
4.4.3.2 Parámetros biológicos.....	68
4.5 Bioensayo de pigmentación.....	71
4.5.1 Análisis proximal de ingredientes.....	71
4.5.2 Análisis proximal de las dietas.....	71
4.5.3 Evaluación nutricional.....	71
4.5.3.1 Calidad de agua.....	71
4.5.4 Evaluación de pigmentación.....	74
4.5.4.1 Relación hepatosomática.....	74
4.5.4.2 Cuantificación de pigmentos.....	74

4.6 Bioensayo de Digestibilidad de la proteína.....	78
4.6.1 Análisis proximal de ingredientes.....	78
4.6.2 Análisis proximal de las dietas.....	78
4.6.3 Digestibilidad de la proteína.....	78
4.7 Bioensayo de actividad inmunoestimulante.....	79
4.7.1 Evaluación nutricional.....	79
4.7.1.1 Calidad de agua.....	79
4.7.1.2 Parámetros biológicos.....	79
4.7.2 Tasa de crecimiento.....	81
4.7.3 Tasa de conversión alimenticia.....	82
4.7.4 Tasa de sobrevivencia.....	82
4.7.5 Actividad de la fenoloxidasa.....	83
4.7.6 Eliminación bacterial.....	83
V. Discusión.....	85
Etapa I - Producción de biomasa pigmentada.....	85
Etapa II - Evaluación nutricional.....	90
VI. Conclusiones.....	94
6.1 - Producción de biomasa pigmentada.....	94
6.2 - Evaluación nutricional.....	95
VII. Literatura citada.....	96
VIII. Anexos.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Los Carotenos como antioxidantes en la prevención de enfermedades.	13
2 - Biosíntesis de betacarotenos y xantófilas en microorganismos.	15
3 - Factores que afectan en la pigmentación de Pencidos.	21
4 - Biotransformación del Betacaroteno - Astaxantina.	22
5 - Curva patrón de la fuerza del pigmento presente calculada para el valor triestímulo Z/ppm carotenos totales de la biomasa pigmentada <i>Phaffia</i> .	32
6 - Sistema de valores proporcionados por la Comisión Internacional de Iluminación (L^*a^*b).	33
7 - Sistema de valores proporcionados por la Comisión Internacional de Iluminación (L^*H^*C).	33
8 - Curva de calibración de dióxido de cromo.	43
9 - Curva de calibración de proteína BSA (bovine serum albumin).	45
10 -Aislamiento de microorganismos(a) y observaciones en el microscopio hitológico(b,c,d).	48
11 -Observaciones al microscopio electrónico, corte transversal de células ovaladas y circulares de las hifas.	49
12 -Pruebas confirmatorias,tirillas API.	49
13 -Producción de ascosporas en medio de Gorodowas.	50
14 -Cinéticas de crecimiento, tratamientos del 1 al 8.	51
15 -Cinéticas de crecimiento , tratamientos del 9 al 16.	53
16 -Observaciones al inicio del cultivo continuo, microscopio histológico.	52
17 -Observaciones de hifas, microscopio estereoscópico.	52
18 -Pigmentación obtenida en los tratamientos del 9 al 16.	54
19 -Cuantificación de Pigmentos obtenidos en los tratamientos del 9 al 16.	55
20 -Producción de Biomasa en los tratamientos del 1 al 8.	56
21 -Producción de Biomasa en los tratamientos del 9 al 16.	57
22 -Rendimiento de Biomasa-sustrato de los tratamientos del 1 al 8.	58
23 -Rendimiento de Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 1 al 8.	59
24 -Rendimiento de Biomasa- sustrato de los tratamientos del 9 al 16.	60
25 -Rendimiento de Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 9 al 16.	60
26 -Cinéticas individuales de cada uno de los microorganismos y del cultivo mixto.	62
27 -De izquierda a derecha las Biomosas HPPR1, HPPR2B y la dieta HPPR1B para los bioensayos.	65
28 -Identificación de los carotenos por cromatografía en capa delgada, observación directa y al UV.	65
29 -Representación gráfica de las tasas de sobrevivencia (a) y crecimiento (b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente proteica.	70
30 -Representación gráficas de las tasas de sobrevivencia(a) y crecimiento(b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente de pigmentos.	73
31 -Imagen de hapatopancreás con las dietas HPPR1 y control grafico de la relación hapatosomalática.	74
32 -Cuantificación de pigmento por el método espectrofotometría de absorción.	75
33 -Camarones cocidos	76
34 -Cuantificación de pigmentos por el método espectrofotométrico de reflectancia (Z).	76
35 -Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría de reflectancia (L^*a^*b)/(L^*H^*C).	77
36 -Digestibilidad de la proteína "in vivo"	79
37 -Promedio de peso de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	81
38 -Promedio final de biomasa de cada dieta.	81
39 -Promedio de tasa de conversión alimenticia <i>Litopenaeus vannamei</i> .	82
40 -Promedio de sobrevivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	82
41 -Actividad de la fenoloxidasa en <i>Litopenaeus vannamei</i> .	83
42 -Eliminación bacterial en <i>Litopenaeus vannamei</i> .	84
